

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl. 7
C12N 15/12

(11) 공개번호 특2002-0064787
(43) 공개일자 2002년08월09일

(21) 출원번호 10 - 2002 - 7003885
(22) 출원일자 2002년03월26일
 번역문 제출일자 2002년03월26일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2000/00809
(86) 국제출원일자 2000년07월26일

(87) 국제공개번호 WO 2002/14488
(87) 국제공개일자 2002년02월21일

(71) 출원인
정광희
경기 성남시 분당구 야탑동 목련마을미원빌라 603동 205호
김두식
서울특별시 서대문구 연희동 84-3

(72) 발명자

정광희
경기 성남시 분당구 야탑동 목련마을미월빌라 603동 205호

김두식
서울특별시 서대문구 연희동 84 - 3

홍성유
경기도 용인시 기흥읍 구갈리 380 한성 1차 아파트 106 - 501

고유석
서울특별시 동작구 상도 2동 156 - 4

손영덕
경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 700 - 1 현대아파트 102 - 902

유원규
서울특별시 서대문구 연희 2동 156 - 5

장양수
경기도 성남시 분당구 수내동 77 쌍용아파트 602 - 705

허진규
서울특별시 종로구 구기동 166 건덕빌라 8 - 303

(74) 대리인 이한영

심사청구: 있음

(54) 한국산 칠점사로부터 유래된 단백질 및 그의 제조방법

요약

본 발명은 한국산 칠점사(*Agkistrodon saxatilis emelianov*)의 독소로부터 유래된 단백질인 삭사틸린(saxatilin), 그의 제조방법과 혈소판 응집억제제 및 항암제로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명자들은 삭사틸린을 한국산 칠점사의 독소에서 정제하고, cDNA를 클로닝하여 재조합 사살틸린을 발현시키는 베틀 및 이것으로 형질전환된 형질전환체를 자체하였으며, 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 재조합 삭사틸린을 수득하였다. 본 발명의 삭사틸린은 효과적으로 혈소판 응집을 억제할 수 있음을 물론, 종양 혈관신생을 강력하게 저해하므로, 삭사틸린은 혈소판 응집억제제 및 항암제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도
도 2

색인어
삭사틸린, 칠점사, 혈소판 응집, 혈관신생 저해

명세서

기술분야

발명은 한국산 칠점사(*Agkistrodon saxatilis emelianov*)로부터 유래된 단백질인 삭사틸린(Saxatilin), 그의 제조방법 및 용도에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 한국산 칠점사의 독소로부터 유래된 단백질인 삭사틸린, 그의 제조방법과 혈소판 응집억제제 및 항암제로서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

종양의 침윤(invasion)과 전이(metastasis)는 암세포가 신체 전반에 걸쳐 치사에 이르기까지 확산되는 과정을 의미한다. 먼저, 암세포가 최초의 위치(주로 내피조직)로부터 분리되어 나온 다음, 암세포와 다른 조직층을 분리하는 기저막(basement membrane)을 통과한다. 이러한 침윤세포들의 일부는 내피세포 중 뿐만 아니라 혈관을 둘러싸고 있는 기저막까지도 통과할 수 있으며, 따라서 혈관을 통하여 자유롭게 순환하다가 결국에는 모세혈관에 정착할 수도 있다. 또한, 이들 암세포가 또 다시 모세혈관을 통과한다면, 이차 종양을 생성할 수도 있는데, 이때, 일차 종양으로부터 분리되어 나온 암세포가 생존하여 다른 조직에 정착함으로써 이차 종양을 생성하게 될 확률은 1/10,000 이하이다(참조: Erkki Ruoslahti, *Scientific American*, 272 - 77, Sep, 1996).

종양전이와 침윤에는 세포와 세포간질(extracellular matrix, ECM)간의 유착성 상호작용이 요구된다. 종양전이의 과정에서, 암세포는 내피세포의 사멸을 초래하는데, 이는 결과적으로 기저세포막을 노출시킴으로써 암세포가 효과적으로 주변부 기질(surrounding stroma)의 세포간질(ECM) 단백질들에 유착할 수 있도록 한다(참조: Hynes, R. O., *Cell*, 48:549, 1987). 이러한 기질 단백질들은 인테그린(integrin) 패밀리를 포함한 특정한 세포표면 수용체와 결합함으로써 세포유착을 촉진시킨다.

구조적으로, 각각의 인테그린은 α , β 서브유닛이 비공유결합으로 연결된 헤테로다이머이다. β 1 서브페밀리는 세포간질 유착의 주요 매개인자로 알려져 왔으며, 다른 기능들, 예를 들면 세포-세포 유착의 직접적인 매개와 같은 기능을 가지고 있을지도 모른다는 연구보고가 있다(참조: Larjava, H. et al., *J. Cell. Biol.*, 110:803 - 815, 1990). 백혈구에서 발견되는 β 2 서브페밀리는 세포-세포 상호작용을 매개하는 수용체를 포함한다. β 3 서브페밀리는 혈소판 당단백

질인 IIb/IIIa 복합체와 비트로넥틴(vitronectin) 수용체를 포함하며, 종양의 침윤성과 악성종양으로의 발달에 있어 중요한 역할을 할 가능성을 내포하고 있다(참조: Albelda, S. M. et al., *Cancer Res.*, 50:6757 - 6764, 1990).

세포마을 가로지르는 인테그린 수용체 복합체는 세포내 세포골격(cytoskeletal) 네트워크와 세포외 환경을 연결시켜 주는 역할을 한다. 피브리노겐(fibrinogen), 비트로넥틴 및 라미닌(laminin)과 같은 세포유착 분자들에서 나타나는 특징적인 핵심 서열들은 세포유착과 세포의 전파(spread) 또는 통합(integration)에 기여하는 것으로 알려져 왔다. 한편, 종양의 생성과 전이는 인테그린의 역할과 밀접한 연관이 있음이 제시되어 왔다(참조: Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E., *Cell*, 60:849 - 859, 1990; Hynes, R. O., *Cell*, 69:11 - 25, 1992; Nip, J. et al., *J. Clin. Invest.*, 96:2096 - 2103, 1995). 피브로넥틴(fibronectin) 수용체 $\alpha 5\beta 1$ 의 과다발현은 CHO(Chinese hamster ovary) 세포의 형질 전이된 표현형을 억제하며, ras로 형질 전이된 세포에서는 인테그린 $\alpha 5\beta 1$ 의 발현이 감소하는 것이 확인된 바 있다(참조: Plantefabre, L. C. and Hynes, R. O., *Cell*, 56:281 - 290, 1989). 피브로넥틴의 폴리머 형태인 수퍼브로넥틴은 종양전이와 생성을 방지하는 것으로 보고된 바 있다(참조: Pasqualini, R. et al., *Nature Medicine*, 2:197 - 1203, 1996).

인테그린 $\alpha v\beta 3$ 는 대부분의 악성종양세포의 표식인자이며, 이러한 사실은 악성 인체 멜라노마(melanoma)의 성장에 있어 전기 유착 수용체의 역할을 제시하는 것이다(참조: Albelda, S. M. et al., *Cancer Res.*, 50:6757 - 6764, 1990). 인테그린 αv 유전자의 발현과 그에 따른 유착성 표현형은 생체내 조건에서 인체 멜라노마의 증식에 직접적으로 관여한다(참조: Felding - Habermann, J. *Clin. Invest.*, 89:2018 - 2022, 1992).

한편, 혈관신생(angiogenesis)은 이미 존재하는 혈관이 성장함으로써 새로운 혈관이 형성되는 과정을 의미한다(참조 : Folkman, J. and D'Amore, P. A., *Cell*, 87:1153 - 1155, 1996). 혈관신생과정은 세포발달, 상처치유 및 염증에 있어서 중요한 역할을 하며, 종양의 발달에도 필수적이다. 혈관신생의 조절은 평활근과 내피세포에서 혈관세포 유착물질에 의하여 이루어진다(참조: Nguyen, M. et al., *Nature*, 365:267, 1993).

종양의 혈관신생은 이에 관련된 양성 조절인자와 음성 조절인자 간의 균형의 변화에 기인할 수도 있다. 이와 관련하여, 최근에는 두 개의 싸이토카인(cytokine) - 의존적 혈관신생 경로가 존재하는 것으로 보고된 바 있으며, 이들은 각기 두 가지 서로 다른 혈관세포 인테그린인 $\alpha v\beta 3$ 와 $\alpha v\beta 5$ 에 의하여 구별되는데, 전기 두 가지 인테그린은 신생된 혈관세포에서 발현되며, bFGF(basic fibroblast growth factor), TNF - α (tumor necrosis factor - alpha), VEGF(vascular endothelial growth factor) 및 인간 종양 단편(fragments of human tumors)에 의하여 유도되는 혈관신생에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(참조: Friedlander, M. et al., *Science*, 270:1500 - 1502, 1995). $\alpha v\beta 3$ 인테그린의 활성화는 혈관 성장과 분화를 촉진하는 생존 신호(survival signal)를 자극하며, 이러한 사실은 싸이토카인과 인테그린 수용체에 의한 신호전달이 새로운 혈관의 성장과 밀접하게 연관되어 있음을 보여준다(참조: Brooks, P. C. et al., *Cell*, 79:1157 - 1164, 1994).

한편, $\alpha v\beta 3$ 와 $\alpha 5\beta 1$ 을 포함하는 몇몇 인테그린들의 강력한 길항제(antagonist)로 알려진 디스인테그린 패밀리는 주로 뱀독으로부터 유래되는 작은 단백질류이다(참조: Niewiarowski, S. et al., *Semin. Hematol.*, 31:289 - 300, 1994). 대부분의 디스인테그린은 혈소판 피브리노겐 수용체인 $\alpha 2\beta 3$ 에 의하여 인식되는 구조 모티프인 Arg - Gly - Asp(RGD) 또는 Lys - Gly - Asp(KGD) 서열을 포함하고 있다. 종래의 연구보고에 의하면, 전기 RGD 서열을 포함하는 디스인테그린은 종양세포가 ECM에 유착되는 것을 방지함으로써 종양전이를 저해하는 것으로 알려져 있다(참조: Tricca, M. et al., *Cancer Res.*, 54(8):4993 - 4998, 1994). 인테그린 $\alpha v\beta 3$ 는 닭 배자와 사람에서 신생된 혈관의 표지로서 규명되었는데(참조: Brooks, P. C. et al., *Science*, 264:569 - 571, 1994), $\alpha v\beta 3$ 에 대한 단일클론항체는 새로 형성된 혈관의 내피세포에서 세포유도사(apoptosis)를 유발함으로써 혈관신생을 저해한다. 인테그린 $\alpha v\beta 3$ 에 리간드가 결합하는 것을 저해하는 것으로 알려진 RGD 서열을 포함하는 합성 웹티드는 CAM(chick chorioallantoic membrane)에서 종양에 의하여 유도되는(tumor - induced) 혈관신생을 억제한다(참조: Brooks, P. C. et al., *Cell*,

99:1157 - 1164, 1994). 또한, 내피세포의 유착과 확산을 돋는 비간접적 혈관신생의 인자로서 잘 알려져 있는 아지오제닌(angiogenin)의 기능은 합성된 RGD 웨პ티드에 의하여 저해받는다. 아울러, 최근에는 뱀 독소 유래의 디스인테그린인 트리플라빈(triflavin)이 TNF- α 에 의하여 유도되는 혈관신생을 저해함이 보고된 바 있다. 이러한 연구보고들은 디스인테그린, 합성된 RGD 웨პ티드 및 항- α v β 3 단일클론항체가 항암제로서 개발될 수 있는 가능성은 제시하였다.

한편, 뱀 독소에는 혈전증(thrombosis)과 치혈(hemostasis)에 영향을 미치는 여러 가지 단백질들이 존재하고 있는 것을 알려져 있다. 그 중에서도 인체내에서 혈소판의 비정상적인 응집으로 인한 혈전을 형성하는 경우 치명적인 혈전증을 야기할 수 있으므로, 각종 뱀독으로부터 이러한 혈소판 응집을 억제하거나 죽진시키는 단백질들이 분리되었고 그들의 특성이 규명되었다. 혈소판 응집기작을 살펴보면, 혈소판에 존재하는 당단백질인 GP IIb - IIIa 수용체에 피브리노겐이 결합함으로써 혈소판 응집이 일어나는데, GP IIb - IIIa 수용체에 대한 피브리노겐의 결합부에는 Arg - Gly - Asp(RGD) 아미노산 서열이 매우 중요한 것으로 알려져 있다(참조: Rouslagt and Pierschbacher, Science, 238:491 - 497, 1987). 따라서, 전기 아미노산 서열을 가진 단백질들은 GP IIb - IIIa 수용체에 피브리노겐이 결합하는 것을 경쟁적으로 방해함으로써, 혈소판 응집을 억제할 수 있는 것이다. 처음에 뱀독으로부터 분리된 GP IIb - IIIa 수용체에 대한 억제제는 주로 5 내지 9kDa의 작은 단백질들이었으나(참조: Huang et al., J. Biol. Chem., 262:16157 - 16163, 1987), 이후 분자량이 큰 억제제를 포함한 여러 가지 혈소판 응집억제제들이 뱀독으로부터 분리되었다. 이들 억제제는 모두 시스테인(Cys) 잔기가 풍부하며, Arg - Gly - Asp 아미노산 서열에 의해 GP IIb - IIIa 수용체에 결합하는 공통적인 특징을 가지고 있다. 또한, 현재 키스트린(Kistrin)(참조: Alder et al., Science, 253:445 - 448, 1991; Alder et al., Biochemistry, 32:282 - 289, 1993), 플라보리딘(Flavoridin)(참조: Klaus et al., J. Mol. Biol., 232:897 - 906, 1993; Senn and Klaus, J. Mol. Biol., 232:907 - 925, 1993), 알보라브린(Albolabrin)(참조: Jaseja et al., Eur. J. Biochem., 218:853 - 860, 1993) 및 에키스타틴(Echistatin)(참조: Chen et al., Biochemistry, 30:11625 - 11636, 1991; Cooke et al., Eur. J. Biochemistry, 202:323 - 328, 1991; Cooke et al., Protein Eng., 5:473 - 477, 1992; Saudek et al., Biochemistry, 30:7369 - 7372, 1991; Dalvit et al., Eur. J. Biochem., 202:315 - 321, 1991) 등의 혈소판 응집 억제제들의 구조는 NMR을 통하여 밝혀졌으며, 이를 억제제들에 의한 GP IIb - IIIa 수용체에의 피브리노겐 결합방해는 동물모델을 통하여 명백히 규명되었다(참조: Collen, J. Clin. Invest., 76:101 - 108, 1985; Gold et al., Circulation, 77:670 - 677, 1988; Yasuda et al., J. Clin. Invest., 81:1284 - 1291, 1988; Collar et al., Blood, 68:783 - 786, 1986; Hanson et al., J. Clin. Invest., 81:149 - 158, 1988)).

이와 관련하여, 한국에 서식하는 대표적인 독사 중에서 살모사(Agkistrodon halys brevicaudus)나 불독사(Caliginus) 독의 경우에는 이미 많은 연구가 진행되어, 한국산 살모사의 독소로부터 유래된 살모신(Salmosin)은 분자량 약 7.5kDa의 단백질로서 강력한 혈소판 응집억제 웨პ티드로 알려졌으나(참조: 대한민국 특허 제 142606호), 칠점사의 독에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 그 이유는 칠점사가 다른 독사에 비해 한국에 서식하는 숫자가 극히 적어, 쉽게 구할 수 없기 때문이다. 그러나, 칠점사는 매우 독성이 강하여 치사율이 높다는 사실이 알려져 있으므로, 아마도 출혈과 관련이 있을 것이라는 가정하에 본 발명을 수행하게 되었다.

본 발명자들은 한국산 칠점사(Agkistrodon saxatilis emelianov)의 독소로부터 혈소판 응집억제활성을 갖는 단백질의 존재를 확인한 결과, 신규한 단백질인 삭사틸린을 발견하고, 전기 단백질에 대한 cDNA를 클로닝한 발현벡터로 형질전환된 미생물을 이용하여 재조합 삭사틸린을 효모 내에서 대량생산할 수 있음을 확인하고, 혈소판의 응집을 저해하는 효과를 보이며, 암세포의 성장 및 전이에 필수적인 종양 혈관신생을 정상 내피세포의 증식에 영향을 미치지 않으면서 강력하게 저해함으로써 암세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 첫번째 목적은 한국산 칠점사의 독소로부터 유래된 삭사틸린을 제공하는 것이다.

본 발명의 두 번째 목적은 전기 삭사틸린을 코딩하는 cDNA를 제공하는 것이다.

본 발명의 세 번째 목적은 전기 cDNA에서 유추된 삭사틸린의 아미노산 서열을 제공하는 것이다.

본 발명의 네 번째 목적은 전기 삭사틸린을 효모에서 발현시키는 발현벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 다섯번째 목적은 전기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.

본 발명의 여섯번째 목적은 전기 형질전환체를 이용하여 재조합 삭사틸린을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 일곱번째 목적은 전기 삭사틸린을 유효성분으로 함유하는 혈소판 응집 억제제를 제공하는 것이다.

본 발명의 여덟번째 목적은 전기 삭사틸린을 유효성분으로 함유하는 항암제를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

상술한 본 발명의 목적 및 구성은 하기 첨부도면 및 설명에 의하여 더욱 명확해 진다.

도 1은 본 발명의 혈소판 응집억제 단백질의 활성을 공지된 혈소판 응집억제제와 비교한 그래프이다.

도 2는 삭사틸린의 발현벡터인 pPSAX의 유전자지도이다.

도 3은 HUVEC의 성장에 대한 재조합 삭사틸린 및 살모신의 효과를 비교하여 나타내는 그래프이다.

도 4a는 비트로넥틴과 HUVEC의 유착에 대한 항- α v β 3 단일클론항체, GRGDSP, GRGETP 및 재조합 삭사틸린의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 삭사틸린과 HUVEC의 유착에 대한 항- α v β 3 단일클론항체, GRGDSP, GRGETP 및 재조합 삭사틸린의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 5a는 bFGF로 유도된 CAM(chick chorioallantoic membrane) 혈관신생을 보여주는 사진이다.

도 5b는 bFGF로 유도된 CAM 혈관신생에 재조합 삭사틸린이 미치는 영향을 보여주는 사진이다.

도 6a는 루이스(Lewis) 폐 종양이 감염되지 않은 건강한 폐의 조직사진이다.

도 6b는 PBS를 처리한 전이성 루이스 폐 종양 조직의 사진이다.

도 6c는 재조합 삭사틸린을 처리한 전이성 루이스 폐 종양 조직의 사진이다.

발명의 상세한 설명

본 발명자들은 삭사틸린을 한국산 칠점사의 독소에서 정제하고, cDNA를 클로닝하여 재조합 삭사틸린을 발현시키는 벡터 및 이것으로 형질전환된 형질전환체를 제작하였으며, 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 재조합 삭사틸린을 수득하였다.

이하, 한국산 칠점사로부터 삭사틸린을 정제하는 방법 및 재조합 삭사틸린을 제조하는 방법을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

한국산 칠점사의 독소를 채취한 다음, 독소를 젤 여과 및 HPLC 역상 크로마토그래피하는 2단계 정제과정을 통하여, 혈소판 응집을 억제하는 단백질을 정제하고, 그의 아미노산 서열을 분석한 결과, 신규한 단백질임을 확인하고 삭사틸린(

Saxatilin)이라 명명하였다. 한국산 칠점사의 독소분비선에서 유래한 cDNA 라이브러리로부터 찾아낸 삭사틸린 cDNA의 N- 말단에 제한효소(XbaI) 염기서열과 단백질 분해효소인 KEX2로 절단될 수 있는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 첨가한 다음, 8.0kbp크기의 발현벡터인 pPIC9의 α - factor 분비신호단백질 C - 말단부위의 XbaI - EcoR I 좌위에 삽입하여 발현벡터 pPSAX을 제작하였다. 제작된 발현벡터는 피키아 속(*Pichia* sp.), 한세눌라 속(*Hansenula* sp.), 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.) 등의 효모에 도입하여 형질전환체를 제조할 수 있으나, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115, SMD 1168, KM71 등의 피키아 파스토리스종 효모에 도입함이 바람직하다.

피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115에 전기 벡터 pPSAX을 도입하여, 형질전환체를 제조하고, 제조된 형질전환체를 " 피키아 파스토리스 Y/pPSAX(*Pichia pastoris* Y/pPSAX)" 라 명명하였으며, 이를 2000년 7월 21일 대한민국 서울시 서대문구 홍제 1동 361 - 221번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁하였다.

제조합 삭사틸린을 제조하는 방법은 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 제조합 삭사틸린을 수득하는 공정을 포함한다: 이때, 형질전환체는 형질전환체를 최소 글리세롤 배지에 접종하여 O.D₆₀₀ 1.0이 될 때까지 배양하고, 원심분리하여 배양액을 제거한 세포를 수득한 다음, 메탄올이 함유된 최소 메탄올 배지에 전기 세포를 혼탁한 후, 유가식으로 배양한다. 여기에 사용되는 최소 글리세롤 배지는 질소원으로서 효모추출물 또는 펩톤 등을 0.5 내지 1.5%정도 포함하고, 탄소원으로서 글리세롤, 텍스트로스 또는 글루코스 등을 0.5 내지 2.5%정도 포함하며, 그 외 극미량의 바이오텐 등을 포함하고, pH는 6.0의 배지이고, 최소 메탄올 배지는 최소 글리세롤 배지에 탄소원으로서 배지에 대하여 0.1 내지 1.0 %(v/v), 바람직하게는 0.3 내지 0.8%(v/v), 가장 바람직하게는 0.5%(v/v)의 메탄올을 함유한 배지이다. 또한, 최소 글리세롤 배지에서 배양할 때, 배양 조건은 25 내지 35°C, 바람직하게는 28 내지 32°C, 가장 바람직하게는 30°C에서 12 내지 24시간, 바람직하게는 16 내지 20시간, 가장 바람직하게는 18시간동안 배양하는 것이고, 최소 메탄올 배지에서 배양할 때는 전기 동일한 배양온도에서 72 내지 120시간, 바람직하게는 84 내지 108시간, 가장 바람직하게는 96시간동안 배양한다.

한편, 전기 형질전환체를 배양한 배양액을 소수성컬럼과 고성능액체 크로마토그래피(HPLC)에 적용하여 제조합 삭사틸린을 순수분리하는 데, 이때 소수성컬럼에 중진되는 레진으로는 페닐 - 세파로스를 사용하고, 이동상으로는 0.5 내지 2M 암모늄 실페이트 용액을 사용함이 바람직하다. 또한, HPLC컬럼으로는 소스 30 컬럼(source 30 RPC column)을 사용하고, 이동상으로는 0.01 내지 0.2%(v/v) TFA (trifluoroacetic acid)가 포함된 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용함이 바람직하다.

상기 제조된 제조합 삭사틸린과 공지의 혈소판 응집억제 펩타이드인 제조합 살모신의 혈소판 응집억제활성을 비교한 결과, 본 발명의 제조합 삭사틸린이 제조합 살모신과 유사한 정도로 혈소판 응집을 억제함을 알 수 있었으나, 삭사틸린을 효모에서 발현시킬 경우, 수율면에서 제조합 살모신보다 우수함을 알 수 있었다. 이에, 효모에서 동일한 발현벡터를 이용하여 발현된 두 제조합 단백질의 아미노산 서열을 비교한 결과, 49번째 아미노산의 차이로 인하여 발현양상 및 효율의 차이가 발생함을 확인하였다: 즉, 제조합 살모신은 48번째 및 49번째 아르기닌으로 인하여, 리신, 아르기닌의 아미노산 서열을 인식하는 효모자체의 시그널 펩티드 분해효소로 인하여 절단될 확률이 높은 반면, 제조합 삭사틸린의 49번 아미노산인 베티오닌으로 인하여 동일한 단백질 분해효소에 의하여 절단될 확률이 낮으므로, 제조합 효모에서 제조합 삭사틸린을 발현시킬 때, 49번째 아미노산은 제조합 삭사틸린의 발현효율 및 안정성의 향상에 큰 역할을 담당하는 것을 알 수 있다.

아울러, 삭사틸린이 종양세포의 전이를 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 종양 혈관신생에 관한 연구 시스템으로 개발된 인간의 태반정맥 내피세포(HUVEC: human umbilical vein endothelial cell) 증식검사 시스템과 혈관신생 CAM(chick chorioallantoic membrane) 시험방법을 이용하여, 삭사틸린이 혈관신생에 미치는 영향을 조사한 결과, 삭사틸린은 종양에 의하여 유도된 혈관신생을 저해함이 확인되었다. 또한, 전기 HUVEC 증식검사에서 관찰된 삭사틸린

에 의한 HUVEC의 증식저해 효과는 삭사틸린이 HUVEC 표면의 비트로넥틴 수용체인 $\alpha v\beta 3$ 인테그린에 직접적으로 결합한 결과임을 확인하였다. 한편, 디스인테그린이 종양세포가 내피에 부착되는 것을 저해함으로써 전이성 종양의 콜로니 형성을 억제한다는 사실은 이미 밝혀졌지만, 이미 형성된 전이성 종양의 성장을 저해할 수 있는지 여부에 관한 보고는 없었으므로, 삭사틸린이 전이성 종양의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, 삭사틸린이 세포독성 없이 매우 효과적으로 전이성 종양의 성장을 억제함을 확인하였다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1: 삭사틸린의 정제

한국산 칠점사(Agkistrodon saxatilis emelianov)로부터 삭사틸린을 정제하기 위하여, 한국산 칠점사로부터 채취한 조(crude) 독소 1ml(302.4mg)을 PBS로 평형화시킨 세파덱스 젤 여과 컬럼(Sephadex G - 75 gel - filtration column, 1.8 x 100cm)에 주입시키다 다음, 20ml/hour의 유속으로 용출시키며 삭사틸린의 활성분획을 수득하였다. 이때, 삭사틸린의 활성은 혈소판 응집저해 평가법(platelet aggregation inhibition assay)으로 측정하였다: 즉, 인간의 과혈소판 혈장(human platelet rich plasma, PRP)을 사용하여, 인간 혈액 400ml로부터 얻어진 혈소판 농축액을 μl 당 300,000개의 혈소판이 되도록 희석한 다음, 이 PRP 희석액 450 μl 와 PBS 50 μl 을 혼합하고, 크로노로그 어그리고미터(Aggregometer, Chromo - Log, U.S.A.)에서 37°C의 온도로 3분간 배양하였다. 다음으로, 콜라겐(2nM)을 첨가하여 혈소판 응집을 야기시킨 다음, 빛 투과도(light transmittance)의 차이를 측정하였다.

이어, 혈소판 응집을 저해하는 활성분획 중 가장 주요한 분획이, Native - PAGE 젤 상에서 7,000 내지 10,000달톤(dalton)의 분자량으로 나타나는 단백질을 포함하는 분획임을 확인한 다음, 이 분획을 모아 0.1%(v/v) TFA(trifluoro acetic acid)를 포함하는 증류수로 평형화시킨 역상 HPLC 컬럼(reverse - phase C18 HPLC column, 7.8 x 300mm)에 주입시키고, 0.1%(v/v) TFA를 포함하는 아세토니트릴(acetonitrile)로 5 내지 45%까지 선형구배(linear gradient)를 걸어 단백질을 용출시킨 결과, 삭사틸린은 아세토니트릴의 농도가 21% 되는 지점에서 용출되었다. 정제된 삭사틸린의 농도를 BCA 정량법을 통해 확인하고, 이를 전체 정제공정의 효율과 비교하였을 때, 전체 뱀독으로부터 얻어진 삭사틸린의 최종 정제효율은 0.2%임을 알 수 있었다.

실시예 2: 삭사틸린의 아미노산 서열 분석

삭사틸린의 아미노산 서열을 분석하기 위하여, 정제된 삭사틸린을 환원조건 하에서 전기영동한 다음, PVDF(Bio - Rad, U.S.A.) 맴브레인으로 일렉트로블라팅(electroblotting) 하였으며, 자동 아미노산 서열분석기를 이용하여 N - 말단 아미노산의 서열을 분석한 결과, GEECDCGAPANP(서열번호 9)의 서열인 것으로 확인되었다.

실시예 3: 질량 분석기를 이용한 삭사틸린의 분자량 측정

삭사틸린의 분자량을 질량 분석기(mass spectrometer; Kratos Kompact Mold II, Kratos Analytical, Manchester, U.K.)를 이용하여 Matrix Laser Desorption Ionization 방법으로 측정한 결과, 7,444, 7,515 및 7647Da의 3가지 다른 분자량이 측정되었다. 이렇게 서로 다른 분자량이 존재하는 이유는, N - 말단 아미노산이 "GEE"로 시작하는 것 이외에, "EAGEE" 및 "AGEE"로 시작하는 삭사틸린의 상동형(isoform)이 존재하는 때문으로 유추되었다.

실시예 4: 삭사틸린을 암호화하는 유전자 서열분석

삭사틸린을 코딩하는 cDNA를 얻기 위하여, 우선 한국산 철점사의 독소분비선(venom gland)으로부터 Oligo - dT 셀룰로오스를 이용하여 mRNA를 분리하였으며, 전기 mRNA를 주형으로 Oligo - dT 프라이머와 역전사효소를 이용하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 다음으로, 삭사틸린의 N - 말단 서열을 바탕으로 제조한 5' - 프라이머로서, 프라이머 1: 5' - GGNGARGARTGYGAYTGYGG - 3' (서열번호 3) 및 서브클로닝 과정으로 확인된 C - 말단의 서열을 근거로 제작한 3' - 프라이머로서, 프라이머 2: 5' - CGCATGCAACGGATTCTCG - 3' (서열번호 4)를 이용하여, cDNA 라이브러리를 주형으로 하는 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행한 결과, 220bp에 해당하는 유전자 산물을 수득하였다. PCR을 수행하여 얻은 절편을 아가로오스 젤로 분리정제하고, pGEM - T(Promega, U.S.A.) 벡터로 서브클로닝하여 삭사틸린의 cDNA를 포함하는 플라스미드를 수득하였으며, 이를 이용하여 삭사틸린의 cDNA의 유전자 서열을 분석하고(서열번호 2), 분석된 DNA서열로부터 삭사틸린의 전체 아미노산 서열을 유추하였다(서열번호 1).

실시예 5: 삭사틸린과 공지의 혈소판 응집억제 펩타이드와의 활성 비교

삭사틸린과 공지의 혈소판 응집억제 펩타이드인 살모신(Salmosin) (참조: 대한민국 특허 제 142606호, 서열번호 10) 및 GRGDSP(서열번호 7) 펩타이드와의 활성을 비교하기 위하여, 혈소판이 풍부한 인간 혈장(혈장 1L당 3×10^5 개의 혈소판 존재) 225 μ l와 PBS에 용해된 혈소판 응집억제 펩타이드 용액(0.1g/ml) 25 μ l를 혼합하여 5분간 25°C의 조건으로 어그리고미터에서 반응시킨 다음, 응집제인 ADP를 첨가하고 혼탁도를 측정하는 인간 혈소판의 응집분석법을 실시하였다(참조: 도 1). 도 1에서 보듯이, (n)는 삭사틸린; (O)는 살모신; 및, (g)는 GRGDSP(서열번호 7) 펩타이드의 혈소판 응집 저해효과를 나타낸 것이다. 도 1에서 보듯이, 삭사틸린의 IC₅₀ 값이 약 179nM로 확인되었는 바, 이는 살모신의 IC₅₀ 값인 173nM과 비교할 때, 거의 비슷한 활성을 가지는 것으로 평가되었으며, GRGDSP(서열번호 7) 펩타이드보다는 약 1,000배 이상 우수한 활성이었다.

실시예 6: 삭사틸린 유전자의 클로닝

제한효소(XhoI) 염기서열과 단백질 분해효소인 KEX2로 절단될 수 있는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 N - 말단 프라이머인 5' - CCGCTCGAGAAAAGAGAGGGCCGGAGAACATGT - 3' (서열번호 5), 두 개의 번역 종결 코돈(stop codon)과 EcoRI 제한효소 부위를 포함하는 C - 말단 프라이머인 5' - CGGAATTCTCATTAGGCATGGAA GGGAA - 3' (서열번호 6) 및 주형으로서 실시예 4에서 수득한 삭사틸린cDNA를 갖는 플라스미드를 사용하고, 로보사이클러(Robocycler™, Stratagene, U.S.A.)를 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR: polymerase chain reaction)을 실시하였다. PCR반응은 열변성(denaturation) 94°C 1분, 주형과 프라이머 결합(annealing) 55°C 1분 및 프라이머 연장반응(polymerization) 72°C 1분을 1주기(cycle)로하여 30주기를 실시하였다. 이 반응으로부터 증폭된 약 250bp의 DNA절편을 PCR 산물 전용 클로닝 플라스미드인 pBluescriptKS(2.9kbp, Stratagene, U.S.A.)에 T4 DNA 연결효소(ligase)와 반응시켜 재조합 플라스미드를 제작하고, 이를 대장균 XL - 1Blue에 도입하여 형질전환체를 제작하였다. 제작된 형질전환체를 엠피실린 100 μ g/ml가 첨가된 루리아 보타니(LB: Luria Botani) 평판배지에서 배양하여, 흰색 콜로니를 형성하는 형질전환 대장균 군주를 선별한 다음, 이로부터 플라스미드를 추출하여 이를 제한효소 지도분석과 DNA 염기서열 분석(ALF시스템, Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.)을 실시한 결과, PCR반응으로 증폭된 250bp의 절편이 삭사틸린의 cDNA임을 확인하였다. 전기 추출된 플라스미드를 XhoI과 EcoRI으로 절단하여 수득한 DNA 절편을 발현벡터 pPIC9(8.0kbp)의 α - factor 분비신호단백질 C - 말단부위에 삽입하여 삭사틸린의 발현벡터 pPSAX(8.3kbp)를 제작하였다(참조: 도 2).

작제된 pPSAX를 SalI으로 절단하여 선형의 DNA를 수득한 다음, 전기 선형의 DNA를 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도로 함유하는 TE 완충용액에 *Pichia pastoris* GS115 캠피턴드 세포(competent cell) (Invitrogen, U.S.A.) $80\mu\text{l}$ 를 혼합하고, 엘렉트로포레이터(electroporator, Bio-Rad Gene Pulser, U.S.A.)를 사용하여 1.5 KV의 전압조건 하에 형질전환을 수행하였다. 이어, 형질전환된 균주를 히스티딘 결손 아가로스 평판배지에 도말하고, 30°C 에서 3일간 배양하였다. 배양 후, 배지에서 성장한 콜로니를 선별하여 최소 글리세롤 배지(100mM sodium phosphate pH 6.0, Yeast Nitrogen Base 1.34%, biotin $4 \times 10^{-5}\%$, glycerol 1%) 1L에 접종한 다음, 30°C 에서 세포농도가 O.D. $_{600}$ 1.0이 될 때 까지 배양하고, 배양물을 3,000 xg에서 원심분리하여 배지가 제거된 세포만을 수득하며, 수득한 세포를 최소 메탄올 배지(100mM sodium phosphate pH 6.0, Yeast Nitrogen Base 1.34%, biotin $4 \times 10^{-5}\%$, methanol 0.5%)에 혼탁시키고, 30°C 에서 배양하여 제조합 삭사틸린의 발현을 유도하였다. 이어, 24시간 간격으로 메탄올을 0.5%의 농도로 첨가하여 96시간 동안 배양한 결과, 배지내에 삭사틸린이 축적됨을 확인하고, 전기 형질전환 균주를 "피키아 파스토리스 Y/pPSAX (*Pichia pastoris* Y/pPSAX)" 라 명명하였다. 또한, 전기 균주를 2000년 7월 21일 대한민국 서울시 서대문구 홍제 1동 361-221번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁번호 KCCM-10201로 기탁하였다.

전기 배양물을 5000 xg에서 원심분리하여 배양액을 수득하고, 이를 1.5M 암모늄 살레이트 용액으로 평형화시킨 페닐-세파로스(Phenyl - sepharose, Bio - Rad, U.S.A.)가 충진된 걸림(1.3 x 20cm)에 주입한 다음, 1M 암모늄 살레이트 용액을 20ml/hour의 유속으로 용출시켜 삭사틸린 활성분획을 수득하였다. 이때, 삭사틸린의 활성은 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다. 이어, 활성분획을 0.1%(v/v) TFA를 포함하는 중류수로 평형화시킨 HPLC 컬럼(source 30 RPC column, 7.8 x 300mm)에 주입시키고, 0.1%(v/v) TFA를 포함하는 0 내지 50%(v/v)의 아세토니트릴 선형구배(linear gradient)를 걸어 단백질을 용출시켜서, 순수분리된 삭사틸린을 수득하였다. 이때, 제조수율은 배양액 1L당 107mg임을 알 수 있었다.

실시예 7: 제조합 삭사틸린의 혈소판 응집저해

실시예 6에서 수득한 삭사틸린을 실시예 1의 혈소판 응집저해 평가법을 통해 특성을 분석하고, 실시예 1에서 수득한 야생형 삭사틸린 및 GRGDSP(서열번호 7)의 결과와 비교하였다(참조: 표 1).

하기 표 1에서 보듯이, 제조합 삭사틸린은 야생형 삭사틸린과 유사한 정도의 혈소판 응집저해 활성을 보였다.

[표 1]

혈소판 응집저해 평가법의 IC₅₀

검색시료	IC ₅₀ (nM)
야생형 삭사틸린	136
제조합 삭사틸린	139
GRGDSP(서열번호 7)	270×10^3

실시예 8: 삭사틸린에 의한 항 혈전작용

마우스에 콜라겐과 에피네프린(epinephrine)을 정맥주사할 때, 폐동맥내에 혈전이 형성되고, 이에 의하여 폐동맥이 폐쇄되어 1분 이내에 대부분의 마우스가 마비, 동공확장, 호흡곤란 및 경련의 증상을 보이며, 5분 이내에 70%의 마우스가 사망한다. 따라서, 실시예 6에서 수득한 제조합 삭사틸린을 정맥주사하여, 전기 혈전증상을 감소시킬 수 있는지 확인하였다.

ICR마우스 꼬리 정맥에 각각 0, 0.1, 0.25 및 0.5mg/kg의 삭사틸린을 함유하는 0.1ml PBS를 주사하고, 10분이 경과한 후, 각각의 마우스에 콜라겐과 에피네프린 혼합액(120 μg 콜라겐 + 12 μg 에피네프린/0.1ml PBS)을 ICR마우스 꼬리 정맥에 다시 주사한 다음, 마우스의 생존률을 측정하였다(참조: 표 2).

[표 2]

삭사틸린(mg/kg) 시험	0	0.1	0.25	0.5
사망군/시험군	18/20	16/20	11/20	3/20
생존률(%)	10	20	55	85

상기 표 2에서 보듯이, 삭사틸린을 처리한 경우, 생존률이 급격히 증가된 결과로 미루어 볼 때, 콜라겐과 에피네프린 혼합용액으로 인한 혈전의 발생을 삭사틸린이 억제하였다고 추측되며, 삭사틸린을 미리 처리한 경우는 이를 나중에 처리할 때보다 향상된 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

실시예 9: 인간의 태반정맥 내피세포(HUVEC)에 대한 재조합 삭사틸린의 효과

재조합 삭사틸린의 아미노산 서열의 49 내지 51번은 RGD 서열을 갖고 있는데, 전기 서열을 가지는 디스인테그린은 b FGF에 의해 유도되는 내피세포의 성장을 억제함이 밝혀져 있는 마, 전기 서열을 포함하는 재조합 삭사틸린이 내피세포의 성장을 억제하는지 알아보기 위하여, 인간의 태반정맥 내피세포(HUVEC: human umbilical vein endothelial cell)를 대상으로 성장억제 평가법을 수행하고, bFGF에 의해 유도되는 내피세포의 성장을 억제하는 것으로 알려진 살모신(서열번호 10)의 효과와 비교하였다.

전기 HUVEC를 젤라틴으로 코팅된 24 - 웨일 마이크로플레이트에 깔고, 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 직후, 배지를 5% 우테아혈청을 포함하는 0.25ml DMEM으로 교체하고, 상기 실시예 6에서 수득한 재조합 삭사틸린과 살모신을 각각 0, 20 및 30 μ g/ml의 농도로 처리한 다음, 20분간 배양하였다. 이어, 세포를 전기 배지에 1 ng/ml의 농도로 용해된 bFGF로 처리하고, 72시간 동안 더 배양한 다음, 세포를 트립신으로 단세포화시키고 세포수를 측정하여 생존률을 계산하였다(참조: 도 3). 도 3에서 보듯이, 살모신과 유사한 양상으로 삭사틸린의 농도가 증가함에 따라, HUVEC의 증식이 억제됨을 알 수 있었으므로, 살모신과 삭사틸린은 유사한 활성을 보임을 알 수 있었다.

실시예 10: 삭사틸린에 의한 HUVEC 유착의 저해

삭사틸린에 의한 HUVEC의 증식저해가 삭사틸린이 HUVEC 표면의 비트로넥틴 수용체인 $\alpha v\beta 3$ 인테그린에 직접적으로 결합한 결과인지를 확인하기 위하여, 삭사틸린이 HUVEC가 96 - 웨일 플레이트에 코팅된 비트로넥틴에 유착하는 것을 저해할 수 있는지 여부를 조사하였다.

96 - 웨일 플레이트를 인산염완충용액(PBS)에 용해시킨 상기 실시예 6에서 수득한 재조합 삭사틸린(1 μ g/웨일) 및 비트로넥틴(0.5 μ g/웨일)으로 4°C에서 16시간 동안 코팅하였다. 전기 플레이트를 세척한 다음, 플레이트 상의 남겨진 단백질 결합부위를 봉쇄시키기 위하여, 10mg/ml의 열변성된 우혈청알부민(BSA)을 처리하여 1시간 동안 배양하고, 플레이트를 사용하기 전에 PBS로 세척하였다. HUVEC를 트립신 - EDTA로 처리하여 단세포화시키고, PBS로 3회 세척한 다음, 무혈청 DMEM에 재현탁시켰다. 5X10⁴ 세포를 항 - $\alpha v\beta 3$ 단일클론항체, 합성된 RGD 펩티드인 GRGDSP(서열번호 7), 합성된 RGE 펩티드인 GRGETP(서열번호 8) 및 삭사틸린과 각각 혼합하여 37°C에서 20분 동안 전배양한 다음, 전기 세포를 전기 96웨일 - 플레이트의 각 웨일에 가하고, 37°C에서 5% CO₂ 및 95% 공기의 조건으로 1시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음, 미부착된 세포들을 PBS로 세척하여 제거하고, 부착된 세포는 고정하여 쿠마씨 블루(Coomassie blue)로 염색하였다. 각 웨일의 540nm에서의 흡광도를 측정하여 상대세포수(relative cell number)를 결정하였다(참조: 도 4a, 도 4b).

도 4a 및 도 4b에서 보듯이, bFGF로 자극된 HUVEC를 GRGDSP(서열번호 7), 삭사틸린 및 항 - $\alpha v\beta 3$ 단일클론항체와 함께 미리 배양함으로써 HUVEC가 비트로넥틴에 유착하는 것을 크게 저해할 수 있음을 확인하고(참조: 도 4a), HUVEC가 삭사틸린에 유착하는 것을 저해함을 확인하였다(참조: 도 4b). 이러한 결과들은 삭사틸린이 HUVEC 표면의 $\alpha v\beta 3$ 인테그린에 결합하여, 인테그린 - 배개의 세포유착을 억제함을 시사한다.

실시예 11: 삭사틸린에 의한 혈관신생 CAM(chick chorioallantoic membrane) 검사

생체 내 모델인 CAM(chick chorioallantoic membrane)을 이용하여, bFGF에 의하여 유도되는 혈관신생에 대한 삭사틸린의 효과를 조사하였다. 3일령의 닭의 수정란의 겹질 일부를 조심스럽게 깨고 투명테이프로 밀봉한 다음, 전기 수정란을 37°C, 60% 습도의 조건에서 10일간 배양하여 배자로 발생시킨 후, bFGF를 6ng/배자의 농도로 배자의 CAM 위로 주입하여 혈관신생을 유도하였다. 전기 수정란을 24시간동안 더 배양한 후, (-) 대조군으로서 PBS 및 실시예 6에서 수득한 재조합 삭사틸린 5ug을 CAM에 각각 처리하고, 72시간 후 전기 수정란의 혈관을 관찰하였다(참조: 도 5a, 5b). 도 5a, 5b에서 보듯이, PBS를 처리한 경우에는 정상적인 혈관신생이 이루어졌으나(참조: 도 5a), 삭사틸린을 처리한 경우에는 혈관신생이 저해되었다(참조: 도 5b).

실시예 12: 삭사틸린에 의한 전이성 종양성장의 억제

디스인테그린은 종양세포가 내피에 부착되는 것을 저해함으로써 폐 종양의 콜로니형성을 억제한다. 그러나, 디스인테그린이 전이성 폐 종양의 성장을 저해한다는 보고는 없었는 바, 삭사틸린이 전이성 종양성장에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다.

미합중국종균협회(ATCC, Rockville, Md., U.S.A.)로부터 입수한 루이스 폐 종양 세포(Lewis lung carcinoma cell) 1×10^6 개를 8주령의 웅성 C57BL/6마우스(Charles river, Japan)의 꼬리정맥에 주사하였다. 4일 경과 후, 실시예 6에서 수득한 재조합 삭사틸린을 1.25mg/kg/day의 용량으로 1일 1회 마우스에 정맥주사하였다. 그로부터 4주 경과후, 마우스를 죽여 폐를 수득하고, 폐 종양 콜로니의 개수를 해부현미경으로 측정하였다. 그 결과, 삭사틸린이 전이성 종양성장을 효과적으로 저해되는 것이 확인되었다(참조: 표 3).

[표 3]

삭사틸린에 의한 전이성 루이스 폐 종양의 성장저해

삭사틸린(mg/kg 마우스)	마우스 마리수	평균 폐 종양 콜로니 수	저해율(%)
0	4	15 ± 6	0
1.25	4	0.7 ± 0.6	95

상기와 같은 삭사틸린에 의한 전이성 종양의 성장저해는 종양 혈관신생에 필수적인 α v β 3 인테그린의 작용을 억제함으로써 bFGF에 의하여 유도되는 BCE 세포의 증식을 강력하게 저해하는 삭사틸린의 항-혈관신생 작용에 의하여 설명될 수 있다. 한편, 실험에 사용된 어떤 마우스에서도 삭사틸린 처리에 따른 독성을 관찰되지 않았다.

또한, 폐의 전이성 종양에 삭사틸린이 미치는 직접적인 효과를 관찰하고자, 전기 폐조직에 대하여 조직화학검사를 수행하였다. 즉, 전기 폐조직을 4시간 동안 보우인 용액(Bouin's solution)에 고정시키고, 표준방법에 따라 파라핀으로 고정하였다. 4um 두께의 절단면에 트립신을 37°C에서 10분간 스며들게 하고, PBS로 세척한 다음, 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하고 마운트하였다(참조: 도 6a, 도 6b, 도 6c). 도 6a는 루이스 폐 종양세포로 감염되지 않은 폐의 조직사진이고, 도 6b는 루이스 종양세포로 감염된 폐조직에 PBS를 처리한 폐의 조직사진이며, 도 6c는 루이스 종양세포로 감염된 폐조직에 삭사틸린을 처리한 폐의 조직사진이다. 도 6b 및 도 6c에서 보듯이, PBS를 주입한 대조군에서는 전이성 종양이 뚜렷하게 관찰되었으나(참조: 도 6b), 삭사틸린을 주입한 실험구에서는 종양 콜로니가 관찰되지 않았다(참조: 도 6c). 전술한 바와 같이, 삭사틸린을 주입한 마우스에서 전이성 종양성장이 저해되는 현상은 삭사틸린이 이차 종양의 성장에 필수적인 혈관신생을 저해하기 때문인 것으로 추측된다.

투여방법 및 효과량

본 발명의 삭사틸린을 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 허용가능한 담체를 첨가한 약제학적 조성물은 주사 형태로 투여할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 혼탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

삭사틸린의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 혈전증 치료제로 사용되는 경우, 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 20mg 내지 52mg으로 투여하는 것이 바람직하고, 항암제로 사용되는 경우, 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 30mg 내지 120mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.

급성독성 시험

본 발명에서 혈전증 치료제 및 항암제로서 사용되는 삭사틸린의 급성독성을 알아보기 위하여, 삭사틸린을 웅성 C57BL/6 마우스에 피하주사하고, 투여후 7일간에 걸쳐 마우스의 사망수를 관찰하여 LD_{50} 값을 결정하였는 바, LD_{50} 값은 약 1100mg/kg이었다. 따라서, 상기 표시하는 유효량의 범위에서, 본 발명의 삭사틸린을 유효성분으로 함유하는 혈전증 치료제 및 항암제는 충분히 안전한 약물임을 알 수 있었다.

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 한국산 칠점사의 독소로부터 유래된 삭사틸린, 그의 제조방법과 그를 유효성분으로 하는 혈소판 응집억제제 및 항암제를 제공한다. 본 발명자들은 삭사틸린을 한국산 칠점사의 독소에서 정제하고, cDNA를 클로닝하여 재조합 삭살틸린을 발현시키는 벡터 및 이것으로 형질전환된 형질전환체를 제작하였으며, 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 재조합 삭사틸린을 수득하였다. 본 발명의 삭사틸린은 효과적으로 혈소판 응집을 억제할 수 있음은 물론, 종양 혈관신생을 강력하게 저해하므로, 삭사틸린은 혈소판 응집억제제 및 항암제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

한국산 칠점사(*Agkistrodon saxatilis emelianov*)의 독소로부터 유래된 단백질인 삭사틸린(Saxatilin)을 코딩하며, 서열번호 2의 염기서열로 나타내어지는 cDNA.

청구항 2.

제 1항의 cDNA 염기서열로부터 유추되며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 나타내어지는 삭사틸린(Saxatilin).

청구항 3.

(i) 한국산 칠점사(*Agkistrodon saxatilis emelianov*)로부터 채취한 독소를 젤 여과 크로마토그래피하여 활성분획을 수득하는 공정; 및,

(ii) 전기 활성분획을 고성능 액체 크로마토그래피에 적용하여 삭사틸린을 정제하는 공정을 포함하는 삭사틸린의 제조방법.

청구항 4.

제 1항의 cDNA 염기서열을 포함하는 발현벡터 pPSAX.

청구항 5.

제 4항의 발현벡터 pPSAX를 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115에 도입하여 제조된 형질전환체 피키아 파스토리스 Y/pPSAX(*Pichia pastoris* Y/pPSAX, KCCM - 10201).

청구항 6.

제 1항의 cDNA를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 미생물을 배양하고, 이로부터 제조합 삭사틸린을 수득하는 공정을 포함하는 제조합 삭사틸린의 제조방법.

청구항 7.

제 6항에 있어서,

발현벡터는 pPSAX인 것을 특징으로 하는

제조합 삭사틸린의 제조방법.

청구항 8.

제 6항에 있어서,

형질전환된 미생물은 피키아 파스토리스 Y/pPSAX(*Pichia pastoris* Y/pPSAX, KCCM - 10201)인 것을 특징으로 하는

제조합 삭사틸린의 제조방법.

청구항 9.

제 8항에 있어서,

형질전환된 미생물을 pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35°C에서 12 내지 24시간동안 배양한 다음, 배양물을 원심분리하여 수득한 세포를 0.5 내지 1.5% (v/v)의 메탄올을 포함하는 pH 5.5 내지 6.5, 25 내지 35°C에서 72 내지 120시간동안 다시 배양하는 것을 특징으로 하는

제조합 삭사틸린의 제조방법.

청구항 10.

제 8항에 있어서,

형질전환된 미생물을 배양한 배양액을 소수성킬럼과 고성능 액체 크로마토그래피에 적용하여 삭사틸린을 정제하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는

제조합 삭사틸린의 제조방법.

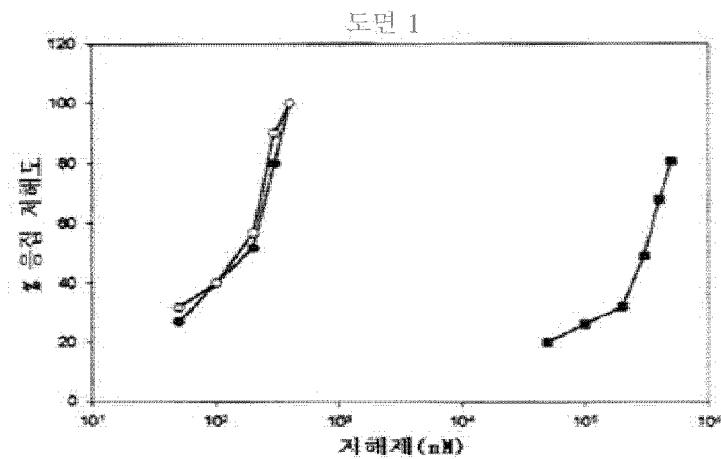
청구항 11.

삭사틸린을 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 혈소판 응집억제제.

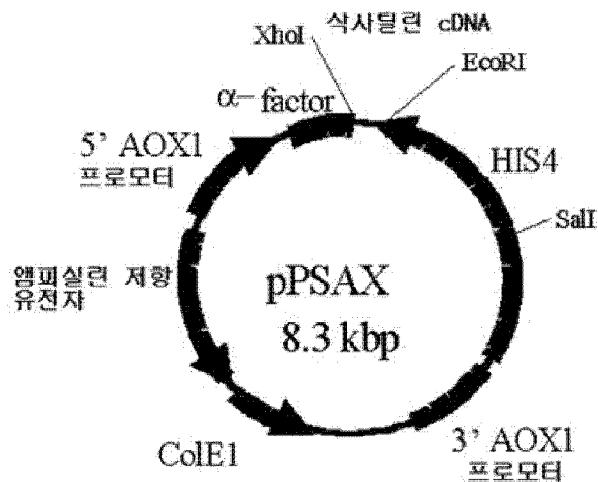
청구항 12.

삭사틸린을 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제.

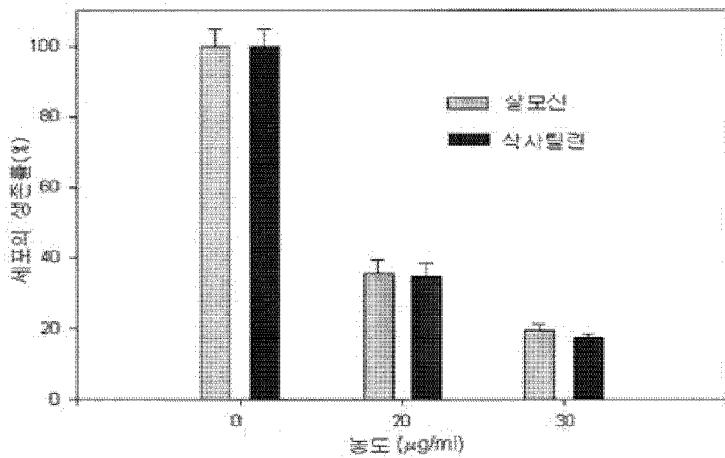
도면



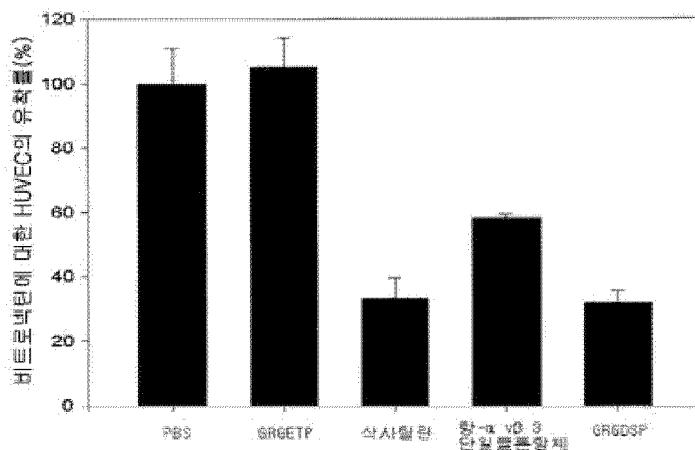
도면 2



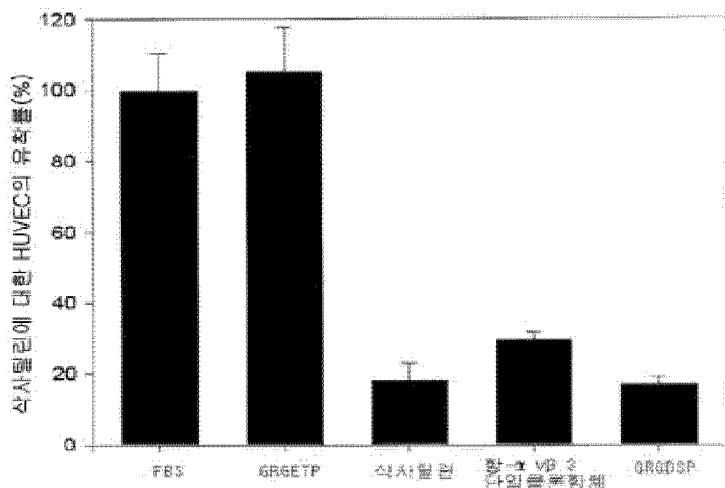
도면 3



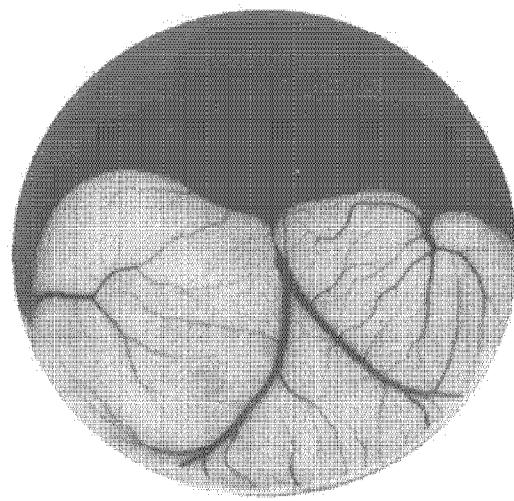
도면 4a



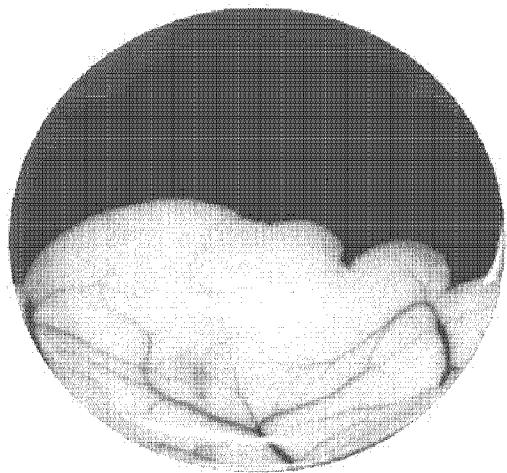
도면 4b



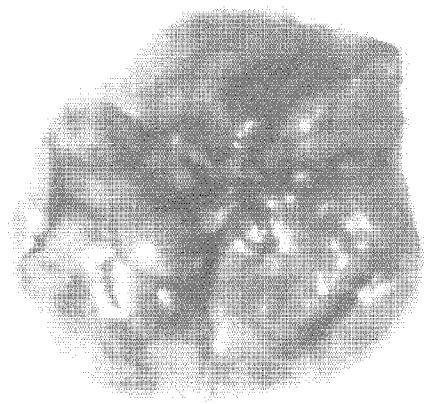
도면 5a



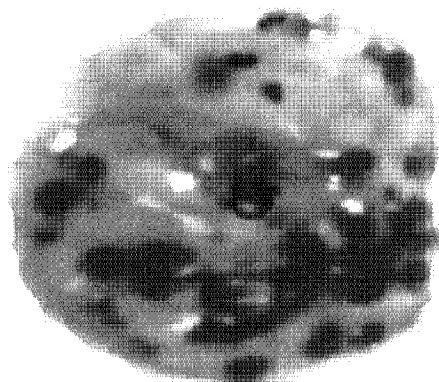
도면 5b



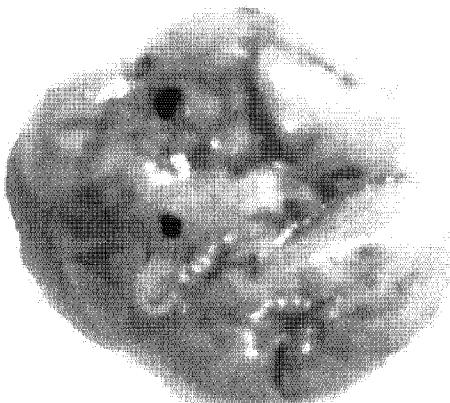
도면 6a



도면 6b



도면 6c



<110> CHUNG, KWANG-HOE
KIM, DOO-SIK
<120> Novel Protein Derived from Agkistrodon saxatilis emelianov and
Process for Preparing the Same
<160> 10
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 73
<212> PRT
<213> Agkistrodon saxatilis emelianov
<400> 1
Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ala Pro Ala Asn Pro Cys Cys
1 5 10 15
Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly

20	25	30
Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg		
35	40	45
Met Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala		
50	55	60
Gly Cys Pro Arg Asn Pro Phe His Ala		
65	70	
<210> 2		
<211> 213		
<212> DNA		
<213> Agkistrodon saxatilis emelianov		
<400> 2		
ggagaagaat gtgactgtgg cgctcctgca aatccgtgct gcgatgctgc aacctgtaaa	60	
ctgagaccag gggcgcaagtg tgcagaagga ctgtgttgtg accagtgcag atttatgaaa	120	
gaaggaacaa tatgccggat ggcaaggggt gatgacatgg atgattactg caatggcata	180	
tctgctggct gtcccgagaaa tcccttccat gcc	213	
<210> 3		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 3		
ggngargart gygaytgygg	20	
<210> 4		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 4		
ggcatggaag ggatttctgg	20	
<210> 5		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 5		
ccgctcgaga aaagagaggc cggagaagaa tgt	33	
<210> 6		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> primer		
<400> 6		
cggaattctc attaggcatg gaaggga	27	
<210> 7		
<211> 6		

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligopeptide
 <400> 7
 Gly Arg Gly Asp Ser Pro
 1 5
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligopeptide
 <400> 8
 Gly Arg Gly Glu Thr Pro
 1 5
 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Agkistrodon saxatilis emelianov
 <400> 9
 Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ala Pro Ala Asn Pro
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Agkistrodon halys brevicaudus
 <400> 10
 Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ser Pro Gly Asn Pro Cys Cys
 1 5 10 15
 Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Gln Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly
 20 25 30
 Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg
 35 40 45
 Arg Ala Arg Gly Asp Asp Leu Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala
 50 55 60
 Gly Cys Pro Arg Asn Pro Phe His Ala
 65 70